ZUR
BIOSYNTHESE DER PROTEINE
IN DER MILCHDRÜSE

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT
zu
MÜNCHEN

vorgelegt von
Helmut Hilpert aus Speyer/Rhein
am 28. Juli 1961

Berichterstatter: Prof. Dr. A. Butenandt
Tag der mündlichen Prüfung: 13. Dezember 1961

IN TIEFER DANKBARKEIT
WIDME ICH DIESE ARBEIT DEM ANDENKEN
AN MEINE MUTTER

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546009_0067

Biochemische Zeitschrift 334, 487—500 (1961)

Proteinsynthese in der Milchdrüse: Gewinnung und Vergleich der Funktion von Drüsenschnitten, Zellen und Zellfraktionen

Von

F. Turba und H. Hilpert*

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Würzburg und der Staatl. Milchwirtschaftl. Lehr- und Forschungsanstalt** in Wangen/Allgäu

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 24. Mai 1961)

Die lactierende Milchdrüse ist ein vorzügliches, aber bisher wenig benutztes Objekt zur Untersuchung der Protein-Biosynthese. Zu den wichtigsten Vorteilen für diesen Zweck gehören: a) die große Schnelligkeit und das ungewöhnliche Ausmaß der Protein-Neubildung in diesem Organ (unter Annahme eines Molgewichts von 10^5 für das Casein errechnet man die Synthese von etwa $9 \cdot 10^3$ Molekülen pro Zelle und Sekunde); b) die Tatsache, daß die Milchproteine anscheinend ohne weitere Umbauprozesse nach ihrer Bildung sezerniert werden; c) die Fülle gut ausgearbeiteter Methoden zur Isolierung und Charakterisierung der gebildeten Milchproteine. Die Bedeutung von Kenntnissen über den Mechanismus der Milchprotein-Biosynthese in der laktierenden Drüse für praktische Probleme der Milchwirtschaft liegt auf der Hand.

Die grundlegenden Kenntnisse über die Anfangs-Phasen der Proteinsynthese konnten mittels einfacher Zellfraktionen gewonnen werden [22]. Zum Nachweis der echten Nettosynthese eines individuellen Proteins dagegen bedurfte es — von wenigen Ausnahmen [16, 5, 15] abgesehen — intakter Zellen oder Gewebe. Wünschenswert ist darum die vergleichende Untersuchung *mehrerer, biologisch verschieden intakter Teilsysteme gleichen Ursprungs* mit Fähigkeit zur Protein-Biosynthese. Bei der Milchdrüse ist dies um so notwendiger, als hier die Kenntnisse zur Proteinbildung von morphologischen Untersuchungen her noch gering sind und selbst über den Sekretionstypus dieser Drüsenzellen unterschiedliche Auffassungen bestehen [6, 18, vgl. auch 3]. Darum haben wir an den Beginn unserer

* Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für eine Beihilfe, Herrn Dir. Dr. R. Schober (Wangen) für die Überlassung eines Arbeitsplatzes, Frau Enkelmann für fleißige und gewissenhafte technische Mitarbeit.

** Unterstützt durch Mittel des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten.

Untersuchungen die Darstellung abgestuft komplexer Präparationen aus Milchdrüsen und den Vergleich ihrer Funktion (bestimmt durch den Einbau von ^{14}C-markiertem Leucin) gestellt.

Experimentelles

1. Vorversuche an Milchdrüsen lactierender Mäuse in vivo

Lactierende weiße Mäuse eines Inzuchtstammes wurden 10—20 Tage nach dem Gebären kurz vor dem Versuch von den Jungtieren getrennt. 0,5 μC ^{14}C-L-Leucin (8,78 mC/mMol, durchgehend markiert, chromatographisch einheitlich) wurden in die Schwanzvene injiziert. Nach 60 min wurden die Tiere getötet, die Milchdrüsen schnell präpariert und in 0,3 m Saccharoselösung homogenisiert. Die Zellfraktionen wurden wie üblich durch Differentialzentrifugieren gewonnen. Zur Isolierung des Proteins aus ihnen und dessen Vorbehandlung zur Aktivitätsbestimmung vgl. 2.

2. Versuche an Milchdrüsenschnitten von Meerschweinchen

Den Versuchstieren wurden die Milchdrüsen in Äthernarkose schnell, aber sorgfältig entnommen. Man brachte die Drüsen sofort in eiskalte, von Sauerstoff-Kohlendioxyd (95:5, Vol-%) durchströmte, 0,2% Glucose enthaltende Krebs-Henseleit-Ringer-Salzlösung [12]. Schnitte von 0,3 mm Dicke wurden mit dem Gerät von Stadie und Riggs [17] gewonnen (bei Vorversuchen an Mäuse-Milchdrüsen mußten die Schnitte von Hand hergestellt werden).

Die Inkubation der Drüsenschnitte von Meerschweinchen erfolgte in 8 ml der Salzlösung (etwa 150 mg feuchtes Schnittmaterial/ml) unter Zusatz von je 2 μMolen jeder der folgenden Aminosäuren (Glycin, L-Alanin, L-Valin, L-Leucin, L-Isoleucin, L-Threonin, L-Serin, L-Cystin, L-Methionin, L-Prolin, L-Phenylalanin, L-Tyrosin, L-Arginin, L-Lysin, L-Histidin, L-Glutaminsäure, L-Asparaginsäure, L-Tryptophan) sowie von 0,1 μC ^{14}C-L-Leucin bei 38°C in Sauerstoff-Kohlendioxyd-Atmosphäre. Nach Ablauf der Versuchszeit wurde die Suspension rasch auf 0°C gekühlt. Die Schnitte wurden dreimal schonend, aber gründlich mit eiskalter Salzlösung, der ein Überschuß inaktiven L-Leucins zugesetzt war, gewaschen und bei 0° C in 8 ml Salzlösung für 1 min im Potter-Elvehjem-Homogenisator zerkleinert. Das Homogenat wurde wie üblich differentialzentrifugiert. Die betreffenden Sedimente bzw. Überstände wurden mit Trichloressigsäure (TCE) bis zu 10% Endkonzentration versetzt. Das ausgefallene Protein wurde wie folgt behandelt: a) dreimaliges Waschen mit kalter 10%iger TCE mit einem Überschuß an inaktivem Leucin; b) Behandeln mit der gleichen Lösung für 20 min bei 90° C (Entfernung der Nucleinsäuren); c) Waschen mit der gleichen Lösung bei Zimmertemperatur; d) Waschen mit 96%igem, darauf mit absolutem Alkohol; e) Behandelt mit dem heißen Gemisch von Äthanol-Äther-Chloroform 2:2:1 (Entfernung von Lipiden); f) Waschen mit heißem Äther, darauf mit wasserfreiem Aceton. Das trockene Protein wurde in wenig Ameisensäure gelöst, auf gewogenen Aluminiumschälchen in gleichmäßigem Film aufgetrocknet, im Vakuum über P_2O_5 und Ätznatron bis zur Gewichtskonstanz belassen und dann auf 0,01 mg genau gewogen (Mengen etwa 500 μg bis 3 mg/cm^2). Die Aktivitätsbestimmung erfolgte im Durchflußzählrohr (Tracerlab SC-16); es wurden jeweils 10000 Impulse gezählt. Die spezifische Aktivität berechneten wir unter Verwendung einer empirischen Selbstabsorptionskurve.

3. Versuche zur Darstellung von Einzelzellen aus Meerschweinchen-Milchdrüsen

a) Mechanisches Trennen der Zellverbände im Homogenisator nach Vorbehandlung mit Äthylendiamintetraacetat. Den Versuchstieren wurden in Äther-

narkose 100 mg Depot-Thrombocid (Fa. Dr. Benend, München) intraperitoneal injiziert. Danach präparierte man nach Aufklappen der unteren Bauchdecke die Milchdrüsen beiderseits frei, wobei die beiden Hauptversorgungsgefäßpaare sorgfältig isoliert wurden. In die arteriellen Gefäße wurde ein Polyvinylkatheter eingeführt und fixiert[1]. Darauf infundierte man unter gleichbleibendem Druck 40 ml Äthylendiamintetraacetat (0,0138 m) enthaltende Durchströmungsflüssigkeit nach Anderson [2] in jede Milchdrüse; die ersten 20 ml waren dabei auf 37° C erwärmt. Bei Durchströmung mit der zweiten Hälfte des Volumens wurde der Abfluß gedrosselt, um auch die feinsten Capillaren blutleer zu spülen. Die von Binde- und Fettgewebe schnell und sorgfältig befreiten, völlig blutleeren Drüsen wurden in eiskalter, mit Sauerstoff-Kohlendioxyd-durchspülter Salzlösung in passende Stücke zerschnitten und jeweils etwa 1 g Gewebe (Feuchtgewicht) in 10 ml eiskalter Salzlösung [12] im Potter-Homogenisator, der auf 0° C vorgekühlt worden war, homogenisiert. Dazu wurde der Teflon-Stempel (Toleranz 0,4 mm) *sehr vorsichtig* 20mal von Hand auf- und abbewegt. Die Suspension wurde durch ein Perlonsieb (600 Maschen/cm²) von gröberen Anteilen befreit und anschließend bei 0° C differentialzentrifugiert (Kühlzentrifuge „International" PR-2, Kopf 296). Dabei wurden zwei Fraktionen (I bei 100 · g für 3 min, II bei 600g · für 5 min) erhalten, die sorgfältig und schonend mit Salzlösung gewaschen wurden. 2 ml jeder der beiden Zellsuspensionen (etwa 0,2 ml Sediment/ml Nährlösung, entsprechend 5—6 mg Zellmaterial Trockengewicht/ml) wurden anschließend mit 0,1 μC ^{14}C-L-Leucin bei 38° C unter Sauerstoff/Kohlendioxyd bei *sehr langsamem* Schütteln inkubiert. Die anschließend schnell auf 0° C abgekühlten Versuchsansätze wurden in der Kühlzentrifuge 5 min bei 600 · g zentrifugiert und die Überstände mit Trichloressigsäure (Endkonzentration 10%) gefällt. Da in beiden Einbauversuchen etwa die gleiche spezifische Aktivität erzielt wurde (für Fraktion I 2061 Impulse/min/mg, für Fraktion II 2783 Impulse/min/mg), wurde in allen weiteren Präparationen das Homogenat zunächst 5 min bei 600 · g, der resuspendierte Niederschlag 5 min bei 400 · g, darauf 3 min bei 100 · g und schließlich 2 min bei 75 · g zentrifugiert; die Überstände wurden jeweils verworfen. Die Inkubation erfolgte in Suspensionen von etwa 5–6 mg Zellmaterial (Trockengewicht)/ml.

b) Vorbehandeln der Zellverbände mit Trypsin (Methode nach Dulbecco [7]). Die nach der oben angegebenen Vorschrift präparierten Milchdrüsen (um 4 g Feuchtgewicht) wurden in einer Salzlösung (8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g Na_2HPO_4, 0,2 g KH_2PO_4, 0,1 g $CaCl_2$, 0,1 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ pro 1000 ml) wie unter 2. beschrieben, in Schnitte (Dicke 0,3 mm, Schnittfläche 1—4 mm²) zerlegt. Das Schnittmaterial wurde mit dieser Lösung mehrmals gewaschen und anschließend mit 600 ml einer auf 37° C vorgewärmten 0,25%igen Lösung von Trypsin in der angegebenen Salzlösung 10 min inkubiert; danach wurde die Flüssigkeit durch 20 ml frische, vorgewärmte Trypsinlösung ersetzt. Mittels einer Pipette mit eingeschliffenem Kolben wurde die Suspension 15mal durch die Öffnung an der Spitze (3 mm Durchmesser) hindurchbewegt. Nach Absitzenlassen der gröberen Teile wurde der Überstand abgegossen, das Sediment erneut mit 20 ml Trypsinlösung behandelt und der gesamte Vorgang 10mal wiederholt. Die vereinigten Überstände wurden bei 600 · g und 0° C während 5 min zentrifugiert. Das endgültig erhaltene Sediment wurde in dem halben Volumen der ursprünglich verwandten Salzlösung suspendiert, 5 min bei 600 · g zentrifugiert und das Waschen zweimal wiederholt. Nach mikroskopischer Kontrolle suspendierte man das Zellmaterial (etwa 100 mg Trockengewicht) in 20 ml Salzlösung; 4 ml davon wurden in üblicher Weise zur Inkubation mit 0,1 μC ^{14}C-Leucin verwendet.

[1] Wir danken Herrn Dr. P. W. Jungblut für seine Mitarbeit bei der Entwicklung der Methode.

4. Gewinnung einer Mikrosomen-Cytoplasmafraktion aus Meerschweinchen-Milchdrüsen; Einbauversuche in das zellfreie System

Die von Fraser u.a. [8] beschriebene Methode zur Gewinnung einer Mikrosomenfraktion aus Meerschweinchen-Milchdrüsen, die dem Verfahren nach Zamecnik u.a. [21] für Rattenleber entspricht, führt nur bei schonendstem Homogenisieren zum Ziel. Besser bewährt sich das Öffnen der Zellen durch osmotische Lyse mit salzfreiem Wasser. Dazu wurden die nach 3a) dargestellten Zellen im Potter-Homogenisator mit eiskaltem, bidestilliertem Wasser versetzt (für das Zellmaterial aus den Milchdrüsen eines Meerschweinchens, entsprechend etwa 150 mg Trockengewicht, mit 12 ml), mit dem lose sitzenden Teflonstempel (Toleranz 0,6 mm) nur eben zur Suspension verteilt und 7 min der Lyse überlassen. Danach wurden Rohrzucker und Salze bis zu folgenden Endkonzentrationen zugesetzt: Rohrzucker 0,25 m; KCl 0,025 m; $MgCl_2$ 0,005 m; $KHCO_3$ 0,035 m. Das p_H der Suspension betrug 7,8. Zur Entfernung der Zellkerne und Mitochondrien zentrifugierten wir 10 min bei 0° C und 15000 · g; je 2 ml des Überstandes (Cytoplasma-Mikrosomenfraktion) dienten direkt zur Inkubation mit 0,5 μC ^{14}C-L-Leucin; über den Zusatz von ATP usw. vgl. Tab. 2.

5. Bestimmung der Atmung von Schnitten und Zellen aus Meerschweinchen-Milchdrüsen

Die unter Einhaltung der Grenzschichtdicke (0,3 mm) mit dem Gerät nach Stadie u. Riggs hergestellten Schnitte (vgl. 2) und das nach 3a) erhaltene Zellmaterial wurden nach der indirekten manometrischen Methode (Gefäßpaarverfahren) von Warburg [19] untersucht.

Als Inkubationsmedium diente Meerschweinchen-Serum, dem 0,05 mg Heparin/ml und 2 mg L(-)-Natriumlactat/ml zugesetzt waren; durch Zugabe von $NaHCO_3$ wurde das Bicarbonat-CO_2 auf 350 mm³/ml eingestellt. Das Serum wurde durch Erhitzen auf 57° C während 10 min von störenden Begleitstoffen befreit. Die Bestimmung der CO_2-Retention des Serums erfolgte in kastenförmigen Reaktionsgefäßen mit siamesischen Birnen (nach Warburg [20]), die im Hauptraum 2 ml Serum, in der einen Birne 1 ml etwa 0,005 n $KHCO_3$, in der anderen Birne 0,2 ml 2n H_2SO_4 enthielten; der CO_2-Gehalt der Bicarbonatlösung war manometrisch bestimmt worden.

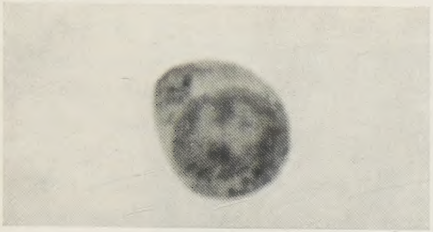
Für die Versuchsansätze gelten folgende Daten: Schnitte bzw. Zellmaterial entsprechend 20 mg Trockengewicht; 4 ml Serum; 38° C; Gasgemisch 95% CO_2 + 5% O_2; Reaktionsgefäße 23,046 bzw. 33,709 ml; Schüttelfrequenz 120 /min, Amplitude 30 mm; Bunsenkoeffizienten (Serum): für CO_2 0,51, für O_2 0,023.

Ergebnisse und Diskussion

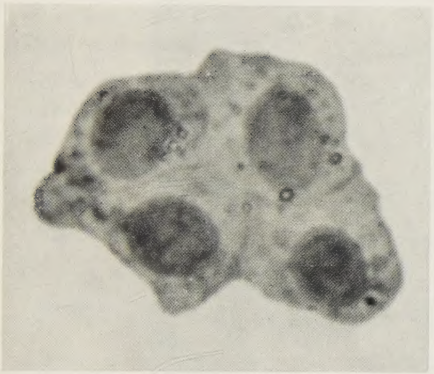
1. Charakterisierung der „Einzelzellen" aus Meerschweinchen-Milchdrüsen

Trotz der hohen Empfindlichkeit der Milchdrüsenzellen, die durch ihre Sekretionsfunktion bedingt ist, gelingt es nach Behandeln mit dem Calcium-bindenden Äthylendiamintetraacetat, die Gewebeverbände mechanisch durch die Scherkräfte des Homogenisators schonend in kleine Zellaggregate und Einzelzellen zu zerlegen, die dann durch Differentialzentrifugieren isoliert werden können (Abb. 1a und b). Selbstverständlich gelingt es stets nur einen Teil der sezernierenden Zellen auf diese Weise zu isolieren; denn einerseits werden die Zellverbände nicht vollständig

zerschert, andererseits wird ein Teil der Zellen, deren Membranen naturgemäß besonders anfällig sind, weiter zerkleinert. Die isolierten Epithelzellen erscheinen durch das Fehlen des Kontakts mit Nachbarzellen



a



b

Abb. 1

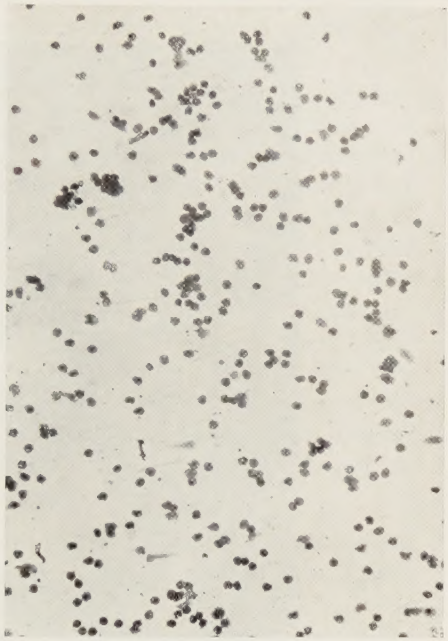


Abb. 2

Abb. 1. a Isolierte Einzelzelle und b Zellaggregat aus einer Meerschweinchen-Milchdrüse. Darstellung durch schonendes Homogenisieren nach Durchströmung des Gewebes mit Äthylendiamintetraacetat. Ungefärbte, unfixierte, in homologem Serum suspendierte Präparate. Vergrößerung a 1500fach b 1350fach. Phasenkontrastaufnahme im „Ultraphot" (Zeiss)

Abb. 2. Isolierte Einzelzellen einer Meerschweinchen-Milchdrüse, Übersichtsbild. Darstellung wie in Abb. 1. Ausstrichpräparat. Vergrößerung 70fach

untypisch und deformiert. Das Übersichtsbild (Abb. 2) läßt aber eine auffällig uniforme Größenverteilung der Gewebefragmente erkennen. Systematische Prüfung der Einzelzellen zeigt allerdings, daß die Menge an Cytoplasma stark wechselt und zahlreiche Fragmente nur relativ dünne Plasmasäume um den Kern enthalten; doch ist das beim Vergleich mit Schnitten[1] (Abb. 3) nicht überraschend, weil auch in diesen ganze Alveolarräume mit niedrigen Zellen ähnlicher Form angetroffen werden. Da die Wirkung des Homogenisierens auf die verschiedenen Zellverbände schwer quantitativ abzuschätzen ist, haben wir uns darauf beschränkt,

[1] Herrn Dr. W. Specht vom Anatomischen Institut der Universität Würzburg danken wir für die Herstellung und Färbung der Schnitte von formalinfixierten Meerschweinchen-Milchdrüsen.

die erhaltenen Fragmente nach ihren Darstellungsbedingungen (vgl. den experimentellen Teil) und nach ihrer Einbaufähigkeit für ^{14}C-L-Leucin zu charakterisieren, ohne eine genauere morphologische Zuordnung anzustreben[1].

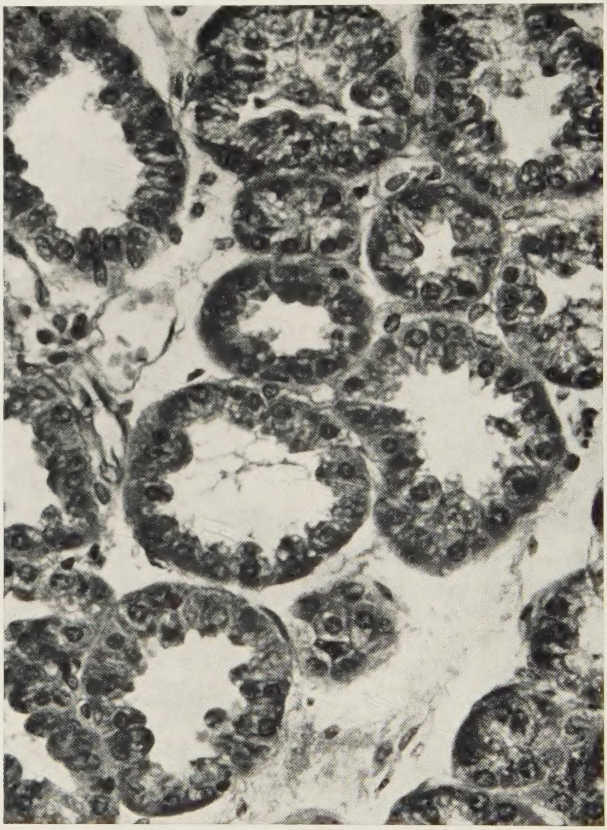


Abb. 3. Gewebeschnitt der Milchdrüse eines lactierenden Meerschweinchens. Schnitt in 10%igem Formol fixiert, mit Hämatoxylin gefärbt und mit Benzopurpurin gegengefärbt. Vergrößerung 400fach

Das beschriebene System hat für Versuche zur Proteinbiosynthese bei allen Experimenten, die extrem kurze Versuchszeiten erfordern, entscheidende Vorteile vor Schnitten; auch läßt es sich zum Unterschied von diesen weitgehend von anhaftendem Protein befreien, das die Erkennung einer Neusynthese stört. Von Zellbruchstücken kann es sehr weitgehend (wenn auch wegen der Gefahr der Zerstörung bei zu lange anhaltendem

[1] Den entscheidenden Beweis für das Vorliegen funktionsfähiger Epithelzellen gibt die in-vitro-Synthese von β-Lactoglobulin durch die isolierten Zellen (F. Turba und H. Hilpert, nachstehende Mitteilung).

Waschen nicht vollständig) gereinigt werden. Die Dauer seiner ungeschädigten Funktionsfähigkeit ist allerdings begrenzter als die von Schnitten (vgl. Abschnitt 2), besonders dann, wenn man als Suspensionsmedium Salzlösungen verwendet; Serum, das besser geeignet ist, kann bei Versuchen zur Biosynthese kleiner Mengen eines spezifischen Proteins aus technischen Gründen meist nicht benutzt werden.

Die Darstellung von Einzelzellen nach Dulbecco [7] durch Trypsinvorbehandlung des betreffenden Gewebes ist in den meisten Fällen so schonend, daß die gewonnenen Zellen in Gewebekulturen gezüchtet werden können. Bei Milchdrüsenzellen ergab sich keine Verbesserung der Ausbeute oder der morphologischen Qualität. Dagegen war die Einbaufähigkeit für markiertes Leucin ungleichmäßiger und geringer: in fünf identischen Versuchen wurden spezifische Aktivitäten von 910, 783, 1050, 855 und 813 Impulsen/min/mg im Vergleich von etwa 2000 Impulsen/min/mg der „nichtenzymatischen" Präparation unter gleichen Bedingungen erhalten. Diese Tatsache, ferner die Gefahr der Proteolyse neu synthetisierter Proteine durch Spuren anhaftenden Trypsins und die einfachere Handhabung der mechanischen Zerkleinerung nach Durchströmung der Drüse mit Äthylendiamintetraacetat gaben den Ausschlag für die Beibehaltung der letzteren Methode.

a) Einbau von ^{14}C-Leucin in Milchdrüsen-Zellen. Zur Prüfung des Einflusses *mechanischer Belastung* der gewonnenen Zellen wurden gleiche

Tabelle 1. *Einfluß des Homogenisierens auf die Einbaufähigkeit von Milchdrüseneinzelzellen*
(Homogenisieren im üblichen Inkubationsmedium)

	Spezifische Aktivität (Impulse/min/mg)	
	Überstand	Niederschlag
Vergleich (nicht homogenisiert)	3438	1409
10 sec homogenisiert (0° C)	250	363
60 sec homogenisiert (0° C)	0	0

Anteile 10 sec bzw. 60 sec in der für Gewinnung von Zellfraktionen üblichen Weise bei 0° C im Potter-Elvehjem-Gerät[1] homogenisiert. Nach beendeter Inkubation mit ^{14}C-Leucin wurden die Ansätze 8 min bei 600 · g zentrifugiert und Niederschläge und Überstände getrennt aufgearbeitet. Die gereinigten Proteine zeigten folgende spezifischen Aktivitäten (Tab. 1).

Das rasche Verschwinden der Einbaufähigkeit mit steigender Dauer des Homogenisierens zeigt die Empfindlichkeit der Zellen, aber auch

[1] Toleranz des motorgetriebenen Stempels 0,5 mm.

ihrer Subfraktionen (vgl. Abschnitt 3) gegenüber der mechanischen Zerstörung ihrer Struktur.

Abb. 4 zeigt die *Zeitabhängigkeit des Einbaus* von ^{14}C-Leucin in das Zellmaterial. Der Einbau in die Zellproteine (Sediment bei 600 · g) beginnt sofort (eine Verzögerung von wenigen Minuten wäre bei der vorliegenden Versuchsanordnung allerdings nicht erkennbar), während die

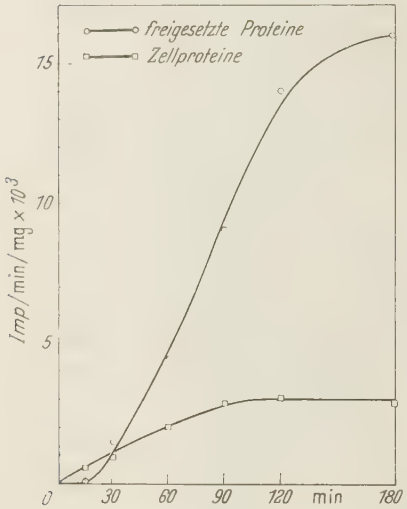


Abb. 4

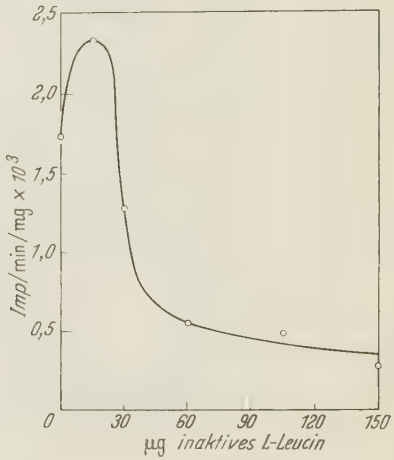


Abb. 5

Abb. 4. Zeitabhängigkeit des Einbaus von ^{14}C-Leucin in isolierte Einzelzellen. 12 ml Zellsuspension mit 1,2 μC ^{14}C-L-Leucin inkubiert. Nach den angegebenen Zeiten je 2 ml entnommen und 8 min bei 600 · g zentrifugiert. Sedimente und Überstände zur Bestimmung der spezifischen Aktivität der Proteine aufgearbeitet

Abb. 5. Abhängigkeit des Einbaus von ^{14}C-Leucin von der Konzentration inaktiven L-Leucins im Inkubationsmedium. Gesamtvolumen 2 ml. Inkubation mit 0,1 μC ^{14}C-L-Leucin, entsprechend 1,5 μg. Versuchsdauer 180 min. Zusatz von inaktivem L-Leucin (15 μg/0,01 ml)

sezernierten Proteine (Überstand bei 600 · g) erst nach einer Anlauf-Phase, dann aber in steilerem Anstieg markiert werden.

Die *Temperatur-Abhängigkeit* der Einbaufähigkeit geht aus Inkubationsversuchen bei 5° C hervor; ein erkennbarer Einbau von ^{14}C-Leucin in die TCE-fällbaren Proteine unter sonst optimalen Bedingungen fand dabei nicht statt.

Den *Einfluß der Konzentration nicht markierten* L-*Leucins* auf die Inkorporierung von ^{14}C-Leucin zeigt Abb. 5. Danach ist ein flaches Maximum des Einbaus schon bei einer Konzentration der inaktiven Aminosäure von 0,06 μM/ml erreicht, schon wenig höhere Konzentrationen hemmen sehr energisch. Wir haben darum auf einen Zusatz inaktiver Aminosäuren zum Inkubationsmedium der Zellen in den meisten Fällen verzichtet.

Zur Untersuchung der isolierten Milchdrüsenzellen auf ihre Fähigkeit zur *Nettosynthese* von Proteinen und deren Abhängigkeit von der Inkubationsdauer wurde in einer Versuchsreihe das Inkubationsmedium (das hier wegen der Länge der gesamten Inkubationsdauer mit 0,06 μM jeder Aminosäure komplettiert war) einschließlich der zugesetzten ^{14}C-Aminosäure jeweils nach 15 min mehrfach gewechselt und in jedem

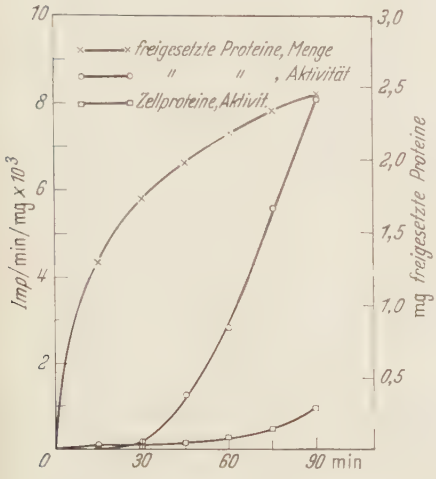


Abb. 6

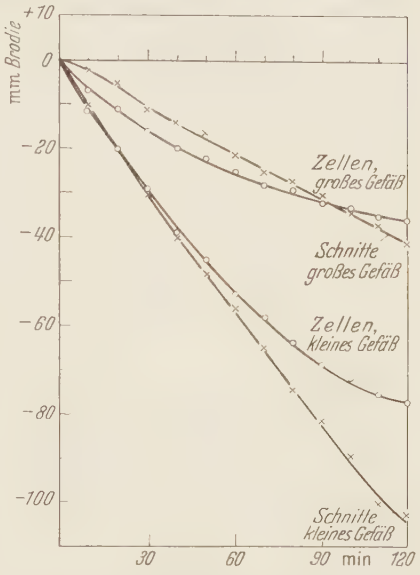


Abb. 7

Abb. 6. Neusynthese von Sekretproteinen durch Einzelzellen aus Meerschweinchen-Milchdrüsen. 20 ml Zellsuspension mit 0,5 μC ^{14}C-L-Leucin und dem kompletten Aminosäuregemisch (0,06 μMol jeder Aminosäure) 15 min inkubiert. Danach Zellen in neues Medium (mit 0,5 μC Leucin und Aminosäuregemisch) übertragen, wieder 15 min inkubiert usw. Werte der spezifischen Aktivitäten für die sezernierten und Zellproteine sowie der freigesetzten Proteinmengen (Bestimmung nach LOWRY jeder 15-min-Periode *additiv* aufgetragen

Abb. 7. Manometrie von Organschnitten und isolierten Zellen aus Meerschweinchen-Milchdrüsen

der erhaltenen Überstände die Menge sezernierter Proteine nach LOWRY [13] bestimmt; gleichzeitig wurde der Einbau des Isotops in die sezernierten und die Zellproteine gemessen. Abb. 6 zeigt das Ergebnis, wobei die den 15-min-Intervallen entsprechenden Mengen- und Aktivitätswerte additiv eingetragen sind. Mit zunehmender Inkubationsdauer nimmt die Aktivität progressiv zu, während die Nettosynthese sezernierter Proteine mit jedem Intervall abnimmt. Man gewinnt den Eindruck, daß die isolierten Zellen im intakten Anfangszustand dem Organ *in situ* entsprechend eine ausgeprägte *de-novo*-Proteinsynthese vollziehen, während mit zunehmender Schädigung bei längerer Inkubationsdauer die Inkorporierung aktiver Aminosäuren ohne entsprechende Neusynthese zu überwiegen beginnt. Die morphologische Mittelstellung der isolierten Zellen zwischen

intaktem Gewebe einerseits und partikulären Zellelementen andererseits findet hier eine biochemische Entsprechung mit einer Verschiebung der Funktion mit zunehmender Inkubationsdauer in Richtung auf das letztere System.

b) Vergleich der Atmung isolierter Einzelzellen aus Meerschweinchen-Milchdrüsen mit Drüsenschnitten. Abb. 7 zeigt den Druckabfall im Gefäßpaar bei der Manometrie von isolierten Drüsenzellen und Drüsenschnitten im Vergleich unter identischen Bedingungen. Man erkennt, daß in den ersten 30—60 min eine so gute Übereinstimmung zwischen den beiden Systemen besteht, wie dies auf Grund der verschiedenen Präparation und Stabilität zu erwarten ist. Danach allerdings machte sich bei den Zellen eine zunehmende Abweichung von der Linearität als Zeichen fortschreitender Schädigung bemerkbar. Auffällig ist der nach der Gefäßpaarmethode zu berechnende Wert[1] der respiratorischen Quotienten (μl CO_2/μl O_2) von größer als 1 in beiden Systemen, eine Folge des Überwiegens des Pentosephosphat-Umwegs über den Embden-Meyerhof-Abbau (vgl. [1, 4, 14, 9]): so fand man z. B. für den 60 min-Wert μl CO_2/μl O_2 217,6/175,2 = 1,24 (Zellen) bzw. 357,9/264,9 = 1,35 (Schnitte) (Retentionskoeffizient des Serums für CO_2 in beiden Fällen $r = 0{,}597$).

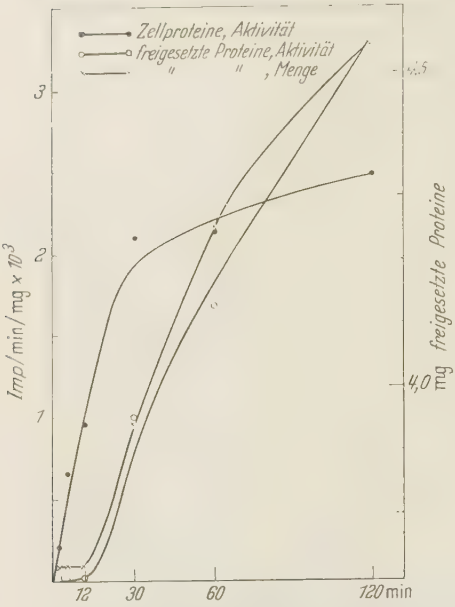


Abb. 8. Einbau von ^{14}C-Leucin in Organschnitte der Meerschweinchen-Milchdrüse. Schnitte (je 1 g feuchtes Material) wurden auf 6 Gefäße verteilt und in je 8 ml Nährlösung mit 0,4 μC ^{14}C-Leucin inkubiert. Unterbrechung nach den angegebenen Versuchszeiten. Überstand nach Zentrifugieren (8 min bei 600 · g) zur Proteinbestimmung nach Lowry (4 ml) und zur Messung der Aktivität (4 ml). Schnitte nach gutem Waschen mit Nährlösung zur Bestimmung der spezifischen Aktivität der Zellproteine

2. Einbau von ^{14}C-Leucin in Schnitte der Meerschweinchen-Milchdrüse

Abb. 8 läßt erkennen, daß der Einbau der markierten Aminosäure in die Zellproteine der Schnitte ohne erkennbare Verzögerung, in die sezernierten Proteine dagegen erst nach einer Anlaufzeit von etwa 12 min erfolgt. Spezifische Aktivität und Menge der ins Medium freigesetzten Proteine nehmen einen analogen Verlauf. Offensichtlich besteht das biologische Material aus weitgehend intakten Zellverbänden, deren Funktion über die gesamte Versuchszeit hinweg unvermindert erhalten bleibt

[1] Zur Berechnung vgl. O. Warburg u. G. Krippahl [20].

(vgl. dagegen die entsprechenden Versuche an Einzelzellen, Abb. 6). Dagegen weist die relativ hohe Proteinkonzentration im Medium zu Versuchsbeginn auf die Anwesenheit präformierter, in den Schnitten in feinsten Lumina enthaltener Proteine hin, die auch durch anhaltendes Waschen nicht völlig zu entfernen sind. Für kurzfristige Versuche (z. B. zur Untersuchung des Mechanismus der Inkorporation) sind darum Schnitte wegen des relativ langen und sehr unterschiedlichen Diffusionsweges der zugesetzten isotop markierten Aminosäure in die Zellen und der sezernierten Proteine aus den Zellen sowie wegen deren „Verdünnung" durch vorgebildetes, imbibiertes Protein (wodurch eine *de-novo*-Synthese verwischt und z. B. die immunologische Charakterisierung erschwert wird) den Einzelzellen unterlegen. Für die präparative *in-vitro*-Synthese hochmarkierter, spezifischer Eiweißstoffe aber (z. B. von β-Lactoglobulin) sind sie das Versuchsobjekt der Wahl.

Vorversuche, in denen die Inkorporierung von ^{14}C-Leucin in *Schnitte* der *Milchdrüsen von Mäusen* mit den Drüsen *in situ* quantitativ verglichen wurden, zeigten weitgehende Übereinstimmung im Verhalten der beiden Systeme.

3. Inkorporation von ^{14}C-Leucin mittels der Mikrosomen-Cytoplasma-Fraktion aus Meerschweinchen-Milchdrüsen

Tab. 2 zeigt den Einbau markierten Leucins in Mikrosomenproteine in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Mediums und der Inkubationsdauer. Zusatz von Adenosintriphosphat und Phosphokreatin erhöhte die Einbaugeschwindigkeit, Guanosintriphosphat war offensichtlich im System ausreichend enthalten und daher ohne Einfluß. Auffällig ist die starke Hemmung durch das zugesetzte Aminosäuregemisch in Konzentrationen, die üblicherweise den Einbau fördern, wohl durch das Vorhandensein eines ausreichenden Reservoirs im Cytoplasma (vgl. dazu auch Abb. 5). Gegenüber den durch mechanisches Homogenisieren gewonnenen Zellpartikeln zeigte das durch osmotische Lyse gewonnenen System durchwegs höhere Einbauraten bei kleinerer Streuung der Einzelwerte.

Vorversuche an Mäuse-Milchdrüsen *in situ* und in entsprechenden Drüsenschnitten ergaben in guter Übereinstimmung die höchste spezifische Aktivität inkorporierten ^{14}C-Leucins für die Proteine der Mikrosomenfraktion. Unter den im Versuchsteil angegebenen Bedingungen fand man z. B. für die Drüse in situ die folgenden spezifischen Aktivitäten (Impulse/min/mg): für Mikrosomen 286, für Cytoplasma 132, für Mitochondrien und Zellkerne 84. Damit gilt auch für die Milchdrüsenzellen, daß der Hauptsyntheseort der Zellproteine die Mikrosomenfraktion ist.

In-vitro-Untersuchungen von Gutfreund [10] ergaben, daß die Aminosäureaktivierung im Cytoplasma von Milchdrüsenzellen fast

ausschließlich Tryptophan (neben wenig Tyrosin) betrifft, während der Einbau in Mikrosomenprotein vor allem die übrigen Aminosäuren umfaßt. Daraus folgt, daß andere Faktoren als die Aminosäureaktivierung den Grad der Inkorporierung bestimmen (vgl. auch die Rolle der L-RNS [8, 11]) und weist auf die Notwendigkeit der Ergänzung von Untersuchungen an Zellfraktionen durch solche an intakten Zellen hin.

Tabelle 2. *Einbau von ^{14}C-Leucin durch das Mikrosomen-Cytoplasma-System aus Meerschweinchen-Milchdrüsen*

Alle Zusätze waren auf p_H 7,8 eingestellt. 0,1 ml des Aminosäuregemisches entsprechen 1 μMol jeder Aminosäure. Adenosintriphosphat lag als Magnesiumsalz vor

^{14}C-Aminosäure μC	Aminosäure Gemisch, ml	ATP μM	Phosphokreatin, μM	GTP μM	Zeit min	Spezifische Aktivität Impulse/min/mg
0,5	0,1	—	—	—	15	10
0,5	—	—	—	—	15	25
0,5	0,1	—	—	—	180	9
0,5	—	—	—	—	180	25
0,5	0,1	1	20	—	15	15
0,5	—	1	20	—	15	79
0,5	—	1	20	—	30	100
0,5	—	1	20	—	60	113
0,5	—	1	20	—	120	131
0,5	0,1	1	20	—	180	110
0,5	—	1	20	—	180	155
0,5	—	1	20	0,2	15	73
0,5	—	1	20	0,2	120	134

4. Vergleich der Funktion der verschiedenen Präparationen aus Milchdrüsen

Die *Drüse in situ* stellt das physiologisch vollkommenste Versuchsobjekt dar, auf das sich alle übrigen Resultate zu beziehen haben. Kurze Versuchszeiten sind damit aber nicht möglich; da die Synthese von Proteinmolekülen häufig in Minuten abläuft [22], scheidet die Versuchsanordnung z. B. für die Erfassung der zeitlichen Aufeinanderfolge partieller Markierungen aus. Auch entfällt die Möglichkeit der quantitativen Erfassung von Milchproteinen unmittelbar nach ihrer Sekretion durch die Zellen.

Drüsenschnitte können zum Unterschied vom in-vivo-Versuch in einem Medium bekannter Zusammensetzung mit isotopen Verbindungen konstanter oder bestimmbarer Konzentration inkubiert werden. Ihre Funktion bleibt über längere Versuchszeiten unvermindert erhalten. Sie gestatten kürzere Versuchszeiten, wenn auch nicht ausgesprochene Kurzzeitversuche von Sekunden bis Minuten. In ihren Lumina imbibiertes, vorgebildetes Protein stört die Verfolgung von *de-novo*-Synthesen. Die Diffusionswege sind lang und stark unterschiedlich, was zu einer Verwischung der Versuchsdetails führt.

Einzelzellen entsprechen in der Organisation der Strukturen noch weitgehend dem Gewebe. Ihre Funktion (Atmung, Einbaufähigkeit) ist für kurze Versuchszeiten den Schnitten vergleichbar. Sie sind prädestiniert für Kurzzeitversuche: die Diffusionswege sind klein und einheitlich, sezernierte Proteine sind sofort erfaßbar, Verunreinigungen durch vorgebildete Milchproteine oder Serumproteine können entfernt werden. Bei längeren Versuchszeiten tritt Schädigung ihrer Funktion ein. Die Permeabilität der Zellmembran für Aminosäuren geht in die Kinetik der Proteinsynthese indirekt mit ein.

Die Mikrosomen-Cytoplasmafraktion liefert die chemisch übersichtlichsten Resultate; vor allem entfällt der Einfluß der Zellmembran. Allerdings wird die Bedeutung der Inkorporierung für die Protein-Neubildung (Netto-synthese) erst durch den Vergleich mit den komplexeren Versuchsobjekten klar. Ein Großteil der organisierten Strukturen der Zelle ist zerstört, der Einbau daher relativ stark vermindert. Ihre Funktion entspricht der von Einzelzellen bei zunehmender Versuchsdauer.

Zusammenfassung

1. Es wird die Gewinnung von Schnitten, isolierten Einzelzellen (durch Trennen der Zellverbände nach Behandeln mit Äthylendiamintetraacetat bzw. mit Trypsin) sowie der Mikrosomen-Cytoplasmafraktion aus Meerschweinchen-Milchdrüsen beschrieben.

2. Der Einbau von ^{14}C-L-Leucin in die sezernierten und Zellproteine bei Verwendung der beschriebenen Systeme wird bestimmt und der Einfluß der Versuchsbedingungen untersucht; die Atmung von Zellen und Schnitten wird verglichen.

3. Die Teilsysteme aus Milchdrüsen werden einander in ihrer Funktion gegenübergestellt und ihre Vorteile und Grenzen für die Untersuchung der Proteinbiosynthese diskutiert.

Summary

1. A method is described for the preparation of slices, isolated single cells, and the microsomes-cytoplasm fraction from mammary glands of the guinea pig. The single cells are prepared by treating the glandular cell material with ethylene diamine tetraacetate and trypsin.

2. The incorporation of ^{14}C-L-leucine into the secreted proteins and the cell proteins is determined by use of the systems descibed. The influence of the experimental conditions is investigated. The respirations of the cells and of the slices are compared.

3. The separated systems from the mammary glands have been compared with each other in regard to their function. The advantages and the limits of the different preparations are discussed.

Literatur

[1] Abraham, S., P. F. Hirsch and J. L. Chaikoff: J. biol. Chem. **211**, 31 (1954).
[2] Anderson, N. G.: Science **117**, 627 (1953).
[3] Bargmann, W., u. A. Knoop: Z. Zellforsch. **49**, 344 (1959).
[4] Black, A. L., M. Kleiber, E. M. Butterworth, G. B. Brubacher and J. J. Kaneko: J. biol. Chem. **227**, 537 (1957).
[5] Campbell, P. N., O. Greengard and B. A. Kernot: Biochem. J. **68**, 18 (1958).
[6] Dabelow, A.: In: Handbuch der mikroskop. Anatomie; Die Milchdrüse, Band III, 3. Teil. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1957.
[7] Dulbecco, R., and M. Vogt: J. exp. Med. **99**, 167 (1954).
[8] Fraser, M. J., H. Shimizu and H. Gutfreund: Biochem. J. **72**, 141 (1959).
[9] Glock, G. E., and P. McLean: Proc. roy. Soc. B **149**, 354 (1958).
[10] Gutfreund, H.: Biochem. J. **68**, 2P (1958).
[11] Hoagland, M. B., M. L. Stephenson, J. F. Scott, L. J. Hecht and P. C. Zamecnik: J. biol. Chem. **231**, 241 (1958).
[12] Krebs, H. A., u. K. Henseleit: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **210**, 33 (1932).
[13] Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall: J. biol. Chem. **193**, 265 (1951).
[14] McLean, P.: Biochim. biophys. Acta **30**, 303 (1958).
[15] Mueller, G. C., S. v. Zahn-Ullmann and W. Schäfer: Fed. Proc. **18**, 290 (1959).
[16] Schweet, R. S., H. Lamfrom and E. Allen: Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **44**, 1029 (1958).
[17] Stadie, W. C., and B. C. Riggs: J. biol. Chem. **154**, 687 (1944).
[18] Turner, C. W.: In: The Mammary Gland, Lucas Broth. Publ. 1952.
[19] Warburg, O.: In: Der Stoffwechsel der Tumoren, Berlin: Springer 1926.
[20] Warburg, O., u. G. Krippahl: Z. Naturforsch. **13b**, 334 (1958).
[21] Zamecnik, P. C., and E. B. Keller: J. biol. Chem. **209**, 337 (1954).
[22] Zillig, W.: In: Turba, F., u. W. Zillig: Das Protein-Molekül, Medizinische Grundlagenforschung, Bd. III, S. 255. Stuttgart: Thieme 1960.

Professor Dr. F. Turba,
Physiologisch-chemisches Institut der Universität Würzburg, Koellikerstraße 7

Biochemische Zeitschrift 334, 501—506 (1961)

Sekretion und Resorption von Proteinen durch isolierte Milchdrüsenzellen

Von
F. Turba und H. Hilpert

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Würzburg
und der Staatl. Milchwirtschaftl. Lehr- und Forschungsanstalt in Wangen/Allgäu

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 24. Mai 1961)

Nach früheren in-vivo-Untersuchungen (Askonas u.a. [1, 2, 3]; Godin u. Work [8]; Barry u.a. [5, 6, 7, 10]) dienen nur die Blutaminosäuren, nicht Blutproteine oder -Peptide dem unmittelbaren Aufbau der Milchproteine in der lactierenden Drüse. Gegen die Folgerungen, die aus der uniformen Markierung der gebildeten Milchproteine gezogen wurden, sind wegen der langen Versuchsdauer von mehreren Stunden berechtigte Einwände erhoben worden (Steinberg u.a. [11]), zumal die de-novo-Synthese eines Proteins schon in Minuten erfolgen kann; tatsächlich scheint die Verwertung phosphorhaltiger Peptide zur Biosynthese von Milchproteinen nachgewiesen zu sein (Sampath u.a. [9]). Dennoch dürften die das Serumprotein betreffenden Schlüsse im wesentlichen zu Recht bestehen. Dagegen scheint eine Regulation der Sekretion von Milchproteinen in der Drüse, die mit der Resorption bestimmter Eiweißstoffe einhergehen könnte, in Abhängigkeit von der Lactationsphase möglich; allerdings wären solche Prozesse an der Drüse in situ und in Drüsenschnitten nicht direkt nachweisbar, weil die Sammlung des Sekrets in Alveolen seine unmittelbare und vollständige Erfassung bei diesen morphologisch hochorganisierten Versuchsobjekten verhindert. Das zellverwandte System, dessen Herstellung beschrieben wurde [12] und das sich für kurze Versuchszeiten funktionell wie isolierte Einzelzellen verhält, eröffnet hierzu die experimentelle Möglichkeit. Den Hinweis darauf erhielten wir aus Versuchen, bei denen vor der Inkorporierung markierten Leucins in Proteine der Drüsenzellen mit inaktiver Aminosäure vorinkubiert wurde.

Substanzen und Methoden. *^{14}C-Leucin*, durchgehend markiert, 8,78 mC/mMol, chromatographisch einheitlich.

Zur Darstellung des *Zellmaterials*, zur Durchführung der *Inkubationsversuche* und zur *Messung der Radioaktivität der Proteine* siehe [12].

Zur Schnell-Dialyse (siehe Abschnitt 3) wurde ein Dünnschichtdialysator verwandt, dessen Stempel gegen die Dialysen-Membrane durch einen Motor langsam gedreht wurde.

Ergebnisse und Diskussion

1. Vorinkubation des Zellmaterials mit inaktivem Leucin

Um den Weg der markierten Aminosäure bei ihrer Inkorporierung in die sezernierten und die Zellproteine von Milchdrüsenzellen näher zu charakterisieren, inkubierten wir das Zellmaterial wechselnde Zeiten mit jeweils dem gleichen Überschuß inaktiven Leucins, bevor wir ^{14}C-Leucin dem Inkubationsmedium zusetzten.

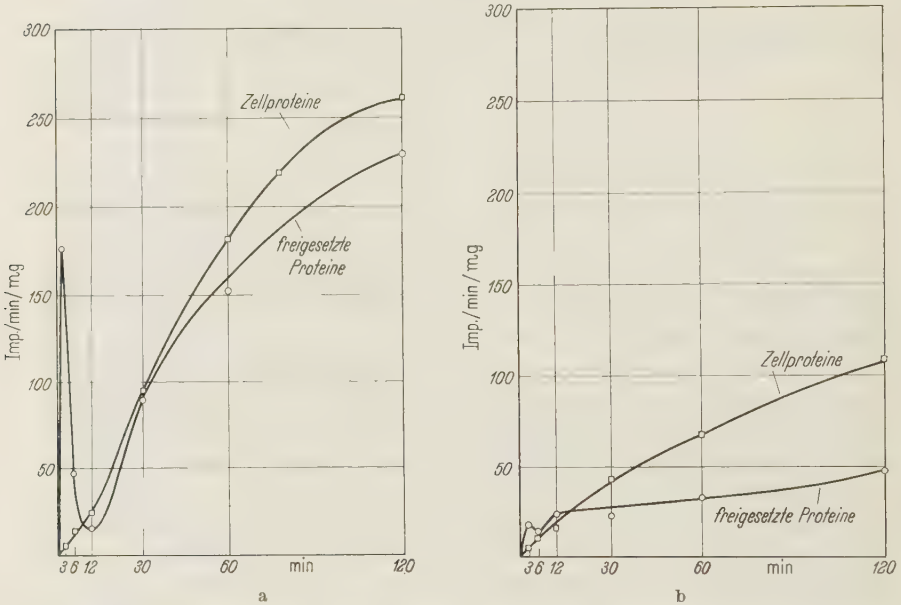


Abb. 1a und b. Vorinkubation isolierter Zellen aus Meerschweinchen-Milchdrüsen mit einem Überschuß inaktiven Leucins. a Zugabe von ^{14}C-Leucin zugleich mit nichtmarkiertem Leucin; b Zugabe von ^{14}C-Leucin 10 min nach der des nichtmarkierten Leucins

Dazu wurden die Inkubationsansätze (jeweils 12 ml mit etwa 30 mg [Trockengewicht] des Zellmaterials) mit 2,7 mg L-Leucin versetzt und 1,8 μC ^{14}C-Leucin, entsprechend dem hundertsten Teil der Menge inaktiver Aminosäure, sofort bzw. nach 10 bzw. 25 min der Reaktion bei 38° zugesetzt. Nach den angegebenen Versuchszeiten (vom Beginn der Zugabe aktiver Aminosäure an gerechnet) wurden je 2 ml der Zellsuspension bei 600 · g in Sediment und Überstand getrennt und die spezifische Aktivität der isolierten Proteine, wie früher beschrieben, bestimmt.

Bei Zusatz der markierten Aminoäsure *zugleich* mit inaktivem Leucin zeigen die Zellproteine den üblichen Anstieg der Aktivität (Abb. 1a); die Einbauquote ist der hemmenden Wirkung des Überschusses inaktiver Aminosäure entsprechend verringert (vgl. [12]). Die Markierung der ins Medium freigesetzten Proteine zeigt einen charakteristischen, stets reproduzierbaren zeitlichen Verlauf: nach einem steilen Anstieg bis 3 min

erfolgt ein starker Abfall bis etwa 12 min nach Zusatz des ^{14}C-Leucins, worauf sich dann ein stetiger Wiederanstieg anschließt.

Bei Zugabe des markierten Leucins nach 10 min Vorinkubation der Zellen mit inaktivem Leucin sinkt der Einbau insgesamt stark ab; der „Anfangs-Gipfel" bei den sezernierten Proteinen verschwindet weitgehend (Abb. 1 b). Bei 25 min Vorinkubation ist dieser letztere Effekt vollständig[1].

Die Erniedrigung der spezifischen Aktivität für sezernierte und Zellproteine mit steigender Zeitdauer der Vorinkubation mit jeweils dem *gleichen* Überschuß inaktiver Aminosäure beweist, daß die von der Zelle aufgenommene Aminosäure nicht in wesentlicher Menge von einem freien „pool" aufgenommen wird, der mit verschiedenen Reaktionsketten im Gleichgewicht stünde. Wird das inaktive Leucin in den zum Protein führenden Weg (Aktivierung, Transfer zum Mikrosomenprotein) vor Zugabe der ^{14}C-Aminosäure eingeschleust, so sinkt deren relativer Einbau mehr und mehr. Das Absinken der spezifischen Aktivität der sezernierten Proteine nach einem anfänglich steilen Anstieg legt die Möglichkeit eines Resorptionseffektes nahe.

2. Inkubation markierter Zellen mit einem „gebrauchten", inaktiven Medium

Um auszuschließen, daß aus eventuell teilgeschädigten Zellen (beim Übergang von 0° der Präparation auf 38° der Inkubation und durch Beginn der Schüttelbewegung des Inkubators) inaktives Zell-Protein passiv in die Lösung „ausgeschüttelt" wird, wodurch eine Verringerung der spezifischen Aktivität der ursprünglich sezernierten Proteine resultieren könnte, wurden Zellen durch Inkubation mit einer relativ hohen Aktivität an ^{14}C-Leucin stark markiert und nach Entfernung des „aktiven" Mediums mit den gleichen Volumen des „inaktiven" Überstands eines völlig analogen Parallelversuchs ohne C^{14}-Leucin weiter inkubiert.

12 ml Zellsuspension wurden mit 3,0 μC ^{14}C-Leucin 30 min bei 38° inkubiert; danach zentrifugierte man 8 min bei 600 · g. Der Überstand wurde verworfen. 12 ml der gleichen Zellsuspension wurden ohne Zusatz in gleicher Weise 30 min inkubiert. Nach 8 min Zentrifugieren bei 600 · g wurde das Sediment verworfen. Das Sediment des 1. und der Überstand des 2. Versuchs wurden vereinigt. Nach den angegebenen Zeiten wurden jeweils 2 ml entnommen, durch Zentrifugieren bei 600 · g Sediment vom Überstand getrennt und in beiden Fraktionen die Proteine isoliert, deren spezifische Aktivität anschließend bestimmt wurde.

Der analoge Verlauf der Kurve für die Zeitabhängigkeit der spezifischen Aktivität der *sezernierten* Proteine, nämlich das Auftreten eines „Gipfels" nach 3 min, eines „Tals" nach 12 min (bei dem zu erwartenden Abfall der Aktivität für die markierten *Zellproteine*), schließt die Möglich-

[1] Die Einbaufähigkeit der Zellen für Aminosäuren war nach 10 bzw. 25 min nicht beeinträchtigt, wie Kontrollversuche zeigten.

keit eines artifiziellen Ausschüttelns nicht markierter Zellproteine aus (Abb. 2).

3. Inkubation nicht markierter Zellen mit markierten, sezernierten Proteinen

Den direkten Nachweis der Resorbierbarkeit von vorher sezernierten Proteinen durch Milchdrüsenzellen führten wir durch deren Inkubation mit ^{14}C-markierten, von dialysablem Material (vor allem ^{14}C-Leucin) befreiten Proteinen des Mediums eines Parallelversuchs.

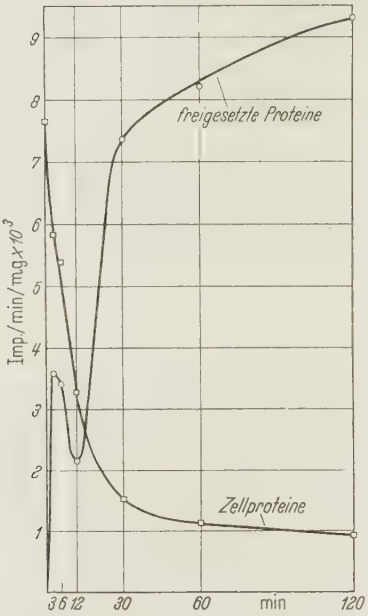


Abb. 2. Inkubation markierter Zellen mit gebrauchtem, nicht markiertem Medium

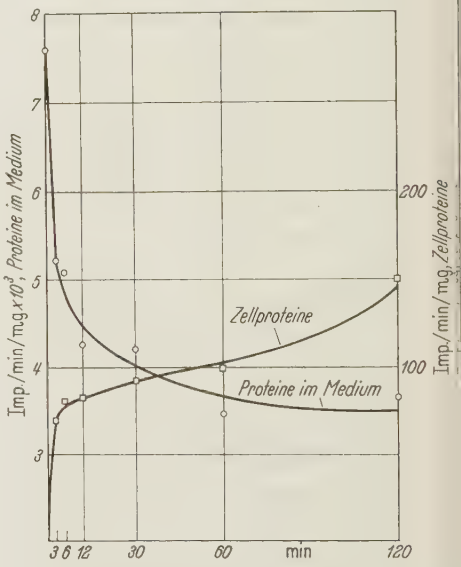


Abb. 3. Inkubation nicht markierter Zellen mit markierten, sezernierten Proteinen

20 ml Zellsuspension wurden mit 6,5 μC ^{14}C-Leucin 180 min bei 38° inkubiert und anschließend 10 min bei 600 · g zentrifugiert. Das Sediment wurde in 5 ml des Mediums resuspendiert und zentrifugiert. Die vereinigten Überstände dialysierten wir in dünner Schicht 9 Std gegen dreimal gewechselte 500 ml Salzlösung (Krebs-Henseleit-Ringer) unter Zusatz eines 100fachen Überschusses an inaktivem L-Leucin, danach 12 Std bei dreimaligem Wechsel der Außenflüssigkeit gegen je 500 ml der Salzlösung ohne Zusatz. In den beiden letzten Außendialysaten war keine Aktivität mehr nachweisbar. Im so gewonnenen, von ^{14}C-Leucin freien Medium wurde die entsprechende Menge nicht markiertes Zellmaterial aus einem Parallelversuch inkubiert. Nach den angegebenen Zeiten wurden jeweils 3 ml Suspension entnommen und bei 600 · g in Sediment und Überstand getrennt. Vor dem Homogenisieren und der Zugabe von Trichloressigsäure wurde das Sediment zweimal mit je 5 ml eiskalter Salzlösung, der ein Überschuß inaktiven Leucins zugesetzt war, sorgfältig gewaschen.

Abb. 3 zeigt das Verschwinden markierten Proteins aus dem Überstand bei gleichzeitigem Zuwachs spezifischer Aktivität der Zellproteine im Sediment als Zeichen eines Resorptionsvorgangs. Das Verhältnis der spezifischen Aktivitäten der beiden Fraktionen entspricht den beiderseitigen Mengen an Protein; im Überstand findet sich etwa ein Hundertstel des Proteins des Sediments.

Die Ansicht, wonach die Sekretion von Protein aus Milchdrüsenzellen bei steigendem Fülldruck der Alveolarräume mechanisch gehemmt würde, findet in den vorstehend geschilderten Experimenten eine verständlichere, biochemische Deutung durch den Hinweis auf die Möglichkeit eines reversiblen Sekretions-Resorptionsgleichgewichts. Koordinierung solcher Versuche mit Feinstruktur-Untersuchungen im Elektronenmikroskop (vgl. [4]) versprechen ein besseres Verständnis der komplexen Prozesse der Milchbildung und -Sekretion.

Zusammenfassung

1. Verwendung isolierter Einzelzellen aus Milchdrüsen macht eine Untersuchung von Sekretions- und Resorptionsvorgängen für Milchproteine möglich, wobei insbesondere kurze Versuchszeiten (3—30 min) von Bedeutung sind.

2. Vorinkubation mit inaktivem Leucin vor Zugabe von ^{14}C-Leucin bewirkt typische Veränderungen der Zeitabhängigkeit der spezifischen Aktivitäten der sezernierten und der Zellproteinen. Sie lassen auf ein rasches Einschleusen der dem Medium zugesetzten Aminosäure in eine fixierte Reaktionskette zum Einbau in Proteine schließen und geben Hinweise auf einen Resorptionsmechanismus für die sezernierten Proteine.

3. Inkubation markierter Zellen mit inaktivem, gebrauchten Medium einerseits, Inkubation nicht markierter Zellen mit markierten, sezernierten Proteinen anderseits schließen Artefakte aus und beweisen die Resorbierbarkeit sezernierter Proteine durch Milchdrüsenzellen.

Summary

1. A study of the secretion and resorption processes of milk proteins has been possible by using isolated single cells of the mammary gland. Short incubation periods (3 to 30 minutes) are of particular importance.

2. Preincubation with inactive leucine before the addition of ^{14}C-leucine causes typical changes in the time course of the specific activities of the secreted proteins and the cell proteins. These results give evidence for a fast feed in mechanism for the added amino acid into a fixed reaction chain for the incorporation into the proteins. Evidence is obtained for a resorption mechanism for the secreted proteins.

3. The incubation of labeled cells with an inactive used medium as well as the incubation of unlabeled cells with labeled secreted proteins exclude artefacts. The results presented prove the possible resorption of secreted proteins by cells of the mammary gland.

Literatur

[1] Askonas, B. A., P. N. Campbell, C. Godin and T. S. Work: Biochem. J. **61**, 105 (1955).
[2] Askonas, B. A., P. N. Campbell, J. H. Humphrey and T. S. Work: Biochem. J. **56**, 597 (1954).
[3] Askonas, B. A., P. N. Campbell and T. S. Work: Biochem. J. **58**, 326 (1954).
[4] Bargmann, W., u. A. Knoop: Z. Zellforsch. **49**, 344 (1959).
[5] Barry, J. M.: Biol. Chem. **195**, 795 (1952).
[6] Barry, J. M.: Biochem. J. **63**, 669 (1956).
[7] Barry, J. M.: Proc. roy. Soc. **149**, 380 (1958).
[8] Godin, C., and T. S. Work: Biochem. J. **63**, 69 (1956).
[9] Sampath, K. S. V., T. A. Sundarajan and P. S. Sarma: J. biol. Chem. **235**, 679 (1960).
[10] Sansom, B. F., and J. M. Barry: Biochem. J. **68**, 487 (1958).
[11] Steinberg, D., M. Vanghan and C. B. Anfinsen: Science **124**, 389 (1956).
[12] Turba, F., u. H. Hilpert: Biochem. Z. **334**, 487 (1961).

Professor Dr. F. Turba,
Physiologisch-chemisches Institut der Universität Würzburg, Koellikerstraße 7

Biochemische Zeitschrift 334, 507—515 (1961)

Nettosynthese von β-Lactoglobulin in Milchdrüsenzellen und -schnitten*

Von

F. Turba und H. Hilpert

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Würzburg und der Staatl. Milchwirtschaftl. Lehr- und Forschungsanstalt in Wangen/Allgäu

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 24. Mai 1961)

Zu den wichtigsten Kriterien einer „echten" Proteinbiosynthese gehört der Nachweis einer tatsächlichen Nettosynthese; bei Verwendung einer isotop-markierten Aminosäure muß gefordert werden, daß diese irreversibel in ein spezifisches Protein inkorporiert wird, und zwar so, daß sie nicht nur endständig, sondern auch im Innern des Moleküls peptidartig gebunden vorliegt [8]. Im Fall der Milchdrüse bietet sich als geeignetstes der sezernierten Milchproteine des *β-Lactoglobin* an, das nächst dem „Casein" den relativ größten Mengenanteil stellt, zum Unterschied von diesem komplizierten Eiweißgemisch aber relativ leicht in einheitlicher Form isoliert werden kann. Als günstigste biologische Versuchsobjekte wählten wir isolierte Zellen und zum Vergleich ihrer Funktion Schnitte von Meerschweinchen-Milchdrüsen.

Experimentelles

1. Gewinnung von β-Lactoglobulin aus Meerschweinchenmilch

Meerschweinchen zwischen dem 4. und 10. Tag der Lactation wurde $^1/_2$ Voegtlin-E-Oxytocin („Orasthin" der Farbwerke Hoechst) i.m. injiziert und die *Milch* mit einer kleinen Glasglocke, die durch einen Polyvinylchloridschlauch mit einem Saugröhrchen verbunden war, durch rhythmisches Anlegen schwachen Vakuums abgemolken; man erhielt so 5–6 ml Milch pro Tier und Melkvorgang. Die Milch wurde eingefroren bei −20° aufbewahrt.

40 ml Meerschweinchenmilch wurden mit 60 ml Wasser verdünnt und durch 15 min Zentrifugieren bei 0° und 3000 U/min weitgehend entfettet. Aus der filtrierten Magermilch wurde bei p_H 4,5 (Glaselektrode) das Casein mit n/10 HCl unter Rühren gefällt und der Niederschlag nach zwölfstündigem Stehen bei 5° noch einmal umgefällt. Die vereinigten Überstände wurden 48 Std bei 5° gegen Wasser dialysiert und anschließend lyophilisiert.

Die Molkenproteine wurden durch *kontinuierliche Papierelektrophorese* vorfraktioniert; die Trennung erfolgte im Spinco-Gerät CP bei 5°. Die Kühlplatte war auf 1° gekühlt; das Pufferniveau betrug 6,5 cm, die Tropfgeschwindigkeit auf die

* Diese und die beiden vorangegangenen Mitteilungen enthalten die wesentlichen Ergebnisse der Dissertation H. Hilperts an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität München. Die Autoren danken Herrn Prof. Dr. A. Butenandt in diesem Zusammenhang für sein Interesse und seine Unterstützung.

Elektrodendochte 28 Tropfen/min, die Stromstärke 90 mA bei 940 Volt. Als Puffer verwandten wir eine 0,025 m Natrium-/Veronallösung (p_H 8,6) mit einem Zusatz von 0,1% Desoxycholat[1]. 1 g Protein in 50 ml wurde mit einer Geschwindigkeit von 0,8 ml pro Stunde aufgegeben. Die den Hauptteil des Lactoglobulins enthaltende Fraktion III (vgl. Abb. 2) wurde erschöpfend gegen Wasser dialysiert und die Lösung lyophilisiert.

Die Reinigung des Proteins erfolgte durch *Papierelektrophorese* nach Turba u. Enenkel [5] in 0,1 m Veronalpuffer (Na-Veronal/HCl) p_H 8,6 bei 4 Volt/cm in Schl. & Sch.-Papier 2043 b während 20 Std. 50 mg der oben bezeichneten Fraktion III in 0,2 ml Puffer wurden in einem 25 cm breiten Strich aufgetragen. Aus dem bei Raumtemperatur schwach getrockneten Pherogramm wurde nach Markierung der Zonen durch Anfärbung von schmalen Randstreifen das Protein mit verdünntem Ammoniak eluiert und das Eluat lyophilisiert. Die Lösung des Rückstands in 6 ml 0,01 m Ammonacetat wurde in 15 min über ein Mischbett filtriert (Amberlit IR 120 $H^{\oplus}$-Form, und Amberlit IRA 400 $OH^{\ominus}$-Form, 20—50 Maschen; 2,5 ml des Gemisches 1 :1 in einer Säule von 0,6 cm Durchmesser; etwas Amberlit IR 120 als Boden) und mit 2 ml Ammonacetatlösung nachgewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden lyophilisiert.

Gewinnung von Antiseren. Verdünnte, entrahmte *Meerschweinchenmilch* (1 mg Protein/ml) bzw. Molkenproteine bzw. Fraktion III (siehe oben) (1 mg Protein/0,6 ml physiologischer Kochsalzlösung) wurden in dreitägigem Turnus während 4 Wochen Kaninchen injiziert (1. Woche dreimal je 1 mg, 2. Woche dreimal je 2 mg pro Injektion; 3. Woche 4, 4 und 6 mg (Milch) bzw. 3, 3 und 4 mg (Proteine); 4. Woche analog 8, 10 und 12 mg bzw. 4, 5 und 6 mg); die verdünnte Milch wurde mit jeweils 0,4 ml Aluminiumhydroxyd-Gel (2%, Behringwerke) vermischt und zu gleichen Teilen subcutan und i.m. verabreicht, während die Molkenproteine und die Fraktion III jeweils zu $^1/_3$ i.v. (Ohrvene) injiziert, der Rest mit 0,4 ml Aluminiumhydroxyd vermischt zu gleichen Teilen subcutan und i.m. gegeben wurden. 10 Tage nach der letzten Gabe wurden die Kaninchen entblutet. Das Serum lyophilisierten wir in 2 ml-Portionen.

Immunelektrophoresen. Zu Immunelektrophoresen in der Mikromodifikation nach Scheidegger [4] verwandten wir 1%igen Rein-Agar (Behring-Werke) in 0,05 m Veronal-Salzsäure-Puffer p_H 8,2 mit einem Zusatz von 0,02% Natriumazid. 10 mm^3 7%iger Lösungen der Proteine wurden bei 3 V/cm in 2 Std getrennt.

2. *Gewinnung von ^{14}C-markiertem β-Lactoglobulin*

a) durch Inkubation von Einzelzellen. Aus den Milchdrüsen zweier lactierender Meerschweinchen (5. Tag der Lactation) wurden die Einzelzellen, wie früher beschrieben, dargestellt, in 50 ml Krebs-Henseleit-Ringer-Lösung [2] suspendiert und mit 12 μC ^{14}C-L-Leucin bei 38° unter O_2/CO_2 (95 : 5%) inkubiert. Danach kühlte man rasch auf 0° ab, zentrifugierte die Suspension bei 1000 x g und 0° 10 min und trennte den Überstand (p_H 7,7) sorgfältig ab. 5 mg Casein aus Meerschweinchenmilch wurden als Träger zugegeben. Fällen und Umfällen der Caseine bei p_H 4,5 erfolgte, wie oben beschrieben. Man erhielt durch Lyophilisieren 25 mg dialysierter „Molkenproteine". 10 mg des Präparats wurden, wie angegeben, durch Papierelektrophorese fraktioniert. Zur Radioautographie wurde das Pherogramm 100 Std auf Röntgenpapier (Agfa) gepreßt. Die quantitativen Aktivitätsbestimmungen erfolgten im Radiopapierchromatograph (Friesecke & Hoepfner) unter Verwendung eines Methandurchflußzählrohrs mit Fenster bei einem Vorschub von 1,5 mm und schrittweiser Zählung bis zu jeweils 1000 Impulsen/Schritt.

[1] Ohne Desoxycholatzusatz ist die Trennung weniger befriedigend.

Die *Isolierung des β-Lactoglobulins* aus dem Pherogramm sowie die Identifizierung und Einheitlichkeitsprüfung durch *Immunelektrophorese* erfolgte wie oben angegeben.

Zur Identifizierung nach der „*Fingerabdruck-Methode*" (vgl. [1]) wurden zum gegenseitigen Vergleich 10 mg β-Lactoglobulin aus Meerschweinchen-Molke einerseits und 5 mg des Produkts der in vitro-Inkubation unter Zusatz von 5 mg β-Lactoglobulin aus Milch andererseits mit Perameisensäure oxydiert (0,3 ml Perameisensäure wirkten 30 min bei 25° ein). Die von Säure befreiten und lyophilisierten Präparate wurden im Volumen von 20 ml mit 1 mg Trypsin (einmal kristallisiert, Pentex inc., Kankakee, Ill.) bei p_H 8,5 im Autotitrator unter Stickstoff hydrolysiert, nach Erreichen der Endspaltung die Lösungen im Vakuum auf 2 ml konzentriert und durch Filtration über 1,5 × 10 cm-Säulen von Dowex-50X2 (200—400 Maschen, $H^{\oplus}$-Form) entsalzt (Waschen mit 40 ml Wasser). Die Elution der Peptide erfolgte mit 30 ml 0,1 n Ammoniak, darauf mit 30 ml 4 n Ammoniak. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Zur Hochspannungsionophorese in der Ausführungsform nach Turba u. a. [7] wurden 5 mg Substanz in Pyridin-Eisessig-Wasser (10 : 0,4 : 89,6) bei p_H 6,1 bei 6000 V (entsprechend 100 Milliamp.) während 2 Std in Schl. & Sch.-Papier 2043 b (38 × 56 cm) in der längeren Laufrichtung elektrophoretisch getrennt. In der dazu senkrechten Richtung chromatographierten wir anschließend mit n-Butanol: Eisessig : Pyridin : Wasser (30 : 6 : 20 : 24) während 20 Std. Das Sichtbarmachen der Flecken erfolgte mit dem Ninhydrin-Collidin-Reagens nach Levy u. Chung [3]. Zur *Radioautographie* wurde der Papierbogen 4 Wochen mit Röntgenpapier in Kontakt gehalten.

b) durch Inkubation von Drüsenschnitten. Aus den Milchdrüsen eines Meerschweinchens wurden, wie früher [6] beschrieben, Schnitte von 0,3 mm Dicke hergestellt, die man in 40 ml der Salzlösung suspendierte. Die Inkubation mit 12,5 μC ^{14}C-L-Leucin und die Weiterverarbeitung erfolgten, wie unter a) angegeben.

Ergebnisse und Diskussion

1. Isolierung und Charakterisierung von β-Lactoglobulin aus Meerschweinchenmilch

Molkenproteine aus Meerschweinchenmilch enthalten unerwartet viel *Serumalbumin*. Daneben ist eine α-Globulinkomponente des Serums unter den Molkenproteinen erkennbar (Abb. 1). Die Ähnlichkeit der elektrophoretischen Beweglichkeiten von Serumalbumin und β-Lactoglobulin dieser Herkunft machen eine Isolierung des letzteren Proteins in absolut reiner Form durch direkte, einmalige Papierelektrophorese unmöglich. Durch Vortrennung in der kontinuierlichen Elektrophorese konnte aber β-Lactoglobulin in der Fraktion III (Abb. 2) soweit angereichert werden, daß eine anschließende Papierelektrophorese dieser Fraktion dann eine Zone völlig reinen Proteins lieferte: Immunelektrophoresen des vorgereinigten Produkts aus der ersteren Fraktion(III) gegen Molkenprotein-Antiserum zeigte noch eine Beimengung von Serumalbumin, Immunelektrophoresen des reinen Präparats aus der letzteren Zone bewiesen seine Einheitlichkeit und Identität mit β-Lactoglobulin (Abb. 3).

2. Isolierung und Charakterisierung von ^{14}C-markiertem β-Lactoglobulin

a) Biosynthese durch Einzelzellen. Das Radioautogramm (Abb 4a) zeigt die Verteilung des eingebauten ^{14}C-Leucins in fünf Proteinzonen des *Papierelektropherogramms*. Das Bild entspricht den Proteinkomponenten der Meerschweinchenmolke (vgl. Abb. 1); nur fehlen selbstverständlich die dem Albumin und dem α-Globulin des Blutserums

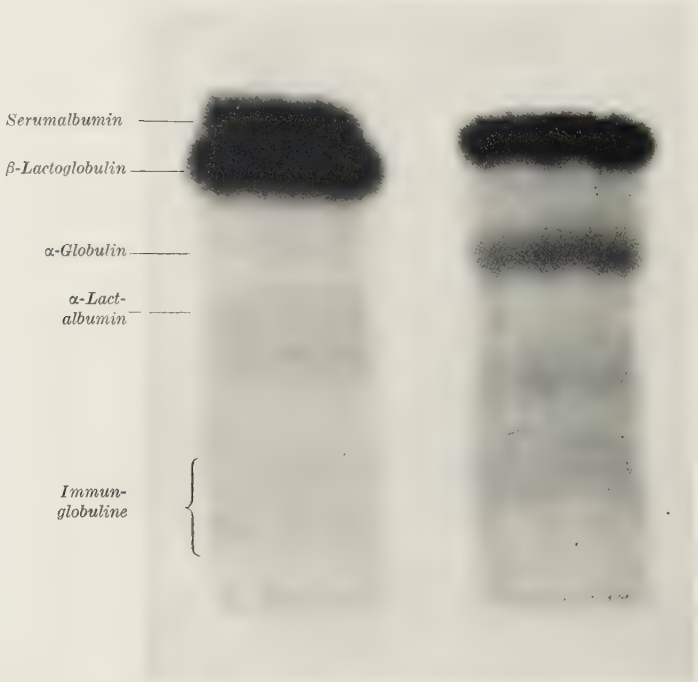


Abb. 1 a und b
Papierelektropherogramme von Molkenproteinen (a) *und Serumproteinen* (b) *des Meerschweinchens*

entsprechenden Zonen, da die Zellen frei von Serumproteinen dargestellt werden konnten (vgl. dagegen die Proteine aus dem Inkubationsmedium von Milchdrüsenschnitten).

Die Verteilung der Radioaktivität über den Elektrophoresestreifen (Abb. 4b) deckt sich *genau* mit der Intensitätsverteilung der angefärbten Banden, die ihrerseits mit der Lage authentischer Molkenproteine im Kontrollversuch übereinstimmen.

Das eluierte ^{14}C-β-Lactoglobulin der in vitro-Synthese erwies sich bei der *Immunelektrophorese* als einheitlich und identisch mit dem β-Lactoglobulin aus Meerschweinchenmilch (Abb. 5).

Das *„Fingerabdruck"-Diagramm* (Hochspannungselektropherogramm und Chromatogramm in zueinander senkrechter Laufrichtung) von

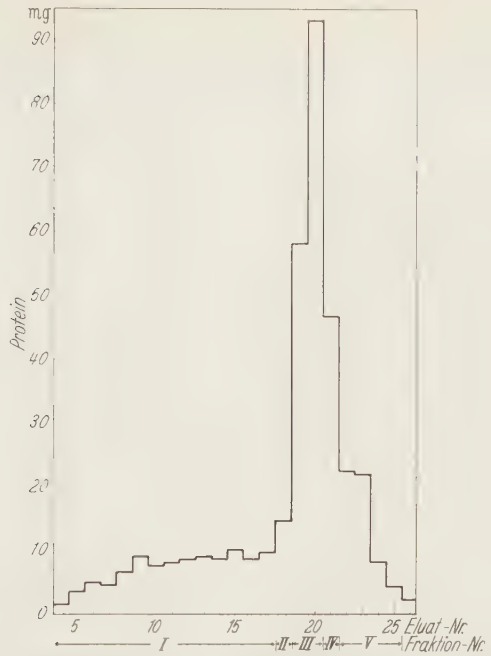


Abb. 2. *Vortrennung der Molkenproteine aus Meerschweinchenmilch durch kontinuierliche Papierelektrophorese* (Spinco-Apparatur). Fraktion III enthält den Hauptteil des β-Lactoglobulins

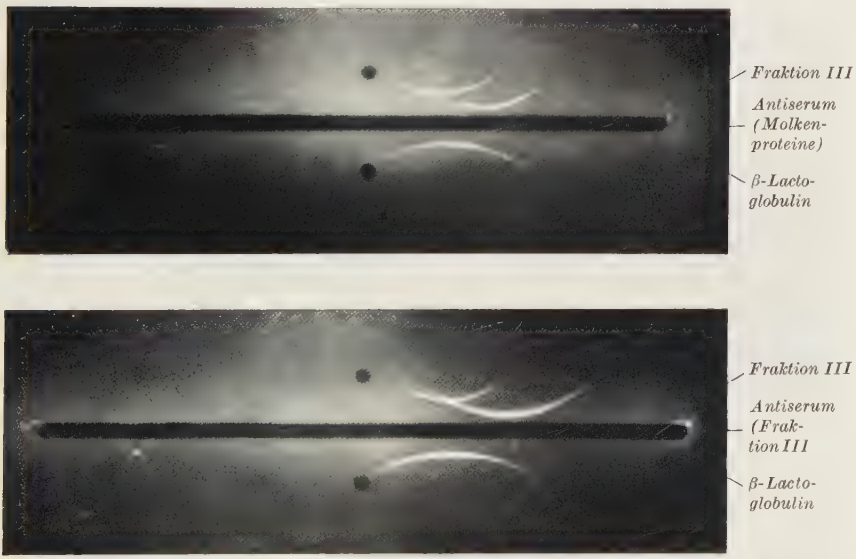
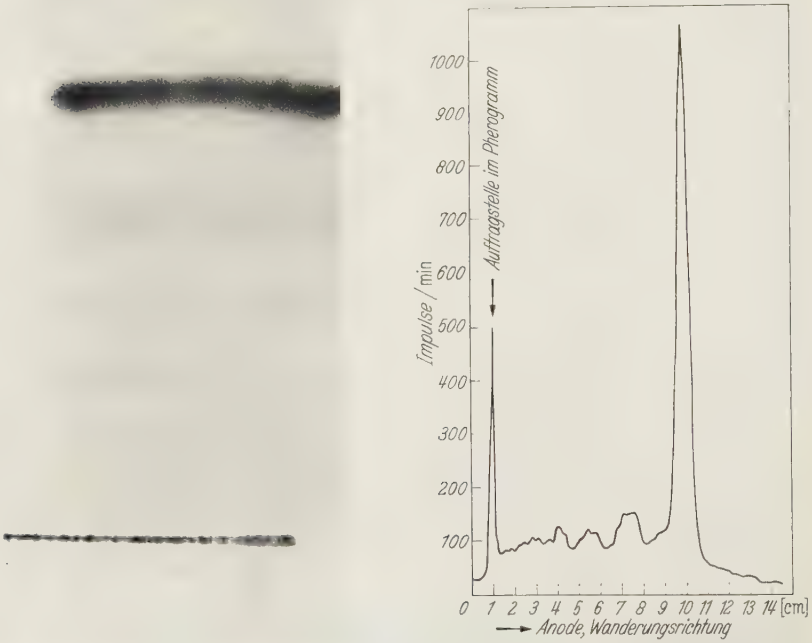


Abb. 3. *Identifizierung und Einheitlichkeits-Nachweis von β-Lactoglobulin aus Meerschweinchenmilch durch Immunelektrophorese*

tryptisch hydrolysiertem ^{14}C-β-Lactoglobulin ließ mit Sicherheit 30 ninhydrinpositive Peptidflecken erkennen (Abb. 6). Das entsprechende *Radioautogramm* zeigte neun deutlich erkennbare Schwärzungsstellen



a b

Abb. 4. a *Radioautogramm eines Papierelektropherogramms ^{14}C-markierter Sekretproteine aus dem Überstand der Inkubation von isolierten Zellen mit ^{14}C-Leucin.* b *Verteilung der ^{14}C-Aktivität im Papierelektropherogramm*

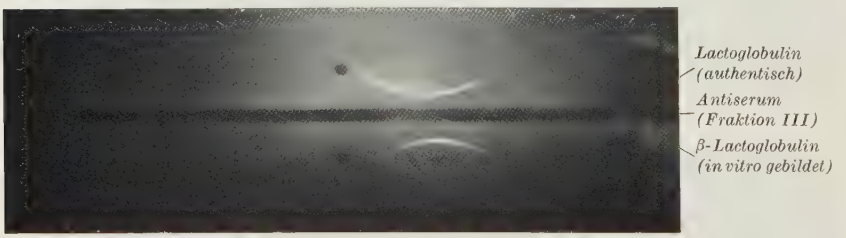
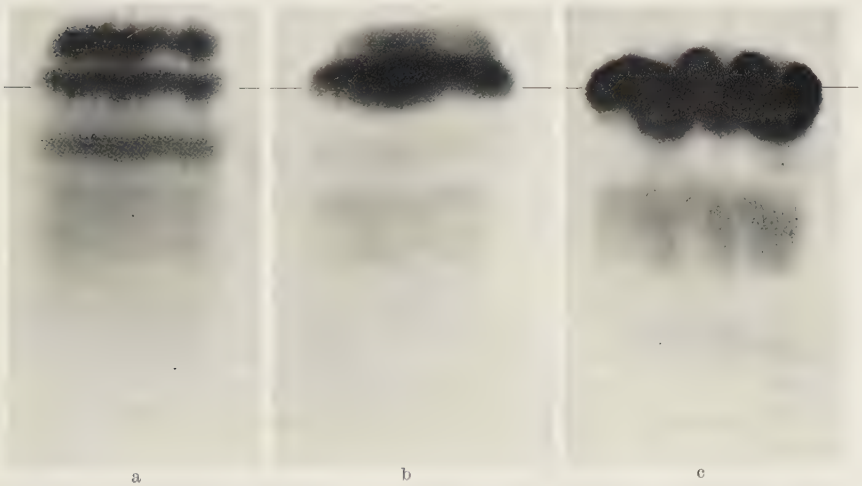


Abb. 5. *Immunelektrophoretische Identifizierung des in vitro synthetisierten β-Lactoglobulins* (isoliert aus dem Inkubationsmedium von Milchdrüsen-Einzelzellen)

für ^{14}C-Leucin-haltige Peptide ausreichender Aktivität, deren jede (mit einer der Grenze der Methode entsprechenden Genauigkeit) mit der Position des jeweils entsprechenden ninhydrinpositiven Peptidflecks der tryptischen Spaltprodukte von authentischem β-Lactoglobulin aus

Meerschweinchenmilch übereinstimmte. Die ^{14}C-Aminosäure wurde daher von den isolierten Zellen in ein spezifisches Protein, und zwar auch ins Innere der Peptidketten eingebaut.

Abb. 6. *„Fingerabdruck"-Diagramm der tryptischen Spaltprodukte von authentischem β-Lactoglobulin aus Meerschweinchenmilch.* Die schraffierten Bereiche (ohne Umrandung!) entsprechen den Schwärzenstellen des Radioautogramms eines analog hergestellten Diagramms der Spaltprodukte des in vitro synthetisierten ^{14}C-β-Lactoglobulins aus dem Inkubationsmedium von Milchdrüsen-Einzelzellen. Die Dicke der Umrandungen gibt die Intensität der Ninhydrinfärbung der nicht markierten Spaltstücke an; gestrichelt umrandete Flecken färbten sich wenig intensiv



a b c

Abb. 7 a und b. *Vergleich der Elektropherogramme* der Molkenproteine aus dem Inkubationsmedium von Milchdrüsenschnitten (a) mit denen aus Meerschweinchenmilch (b). *Radioautogramm* der in vitro-Produkte (*c*)

b) Biosynthese durch Milchdrüsenschnitte. Der Vergleich der Elektropherogramme von Molkenproteinen aus Meerschweinchenmilch

mit den Pherogrammen des Überstands des von Casein befreiten Inkubationsmediums von Organschnitten zeigte völlige Übereinstimmung der Lage der Banden, aber charakteristische Konzentrationsunterschiede (Abb. 7). Das Inkubationsmedium des in vitro-Syntheseversuches enthielt sogar noch größere Mengen an Serumalbumin und α-Globulin als die Molke der in-vivo produzierten Milch. Das entsprechende Radioautogramm zeigte jedoch, daß vorwiegend die dem β-Lactoglobulin entsprechende Zone der in vitro-Biosynthese stark radioaktiv ist; Serumalbumin zeigte ebensowenig Radioaktivität wie das α-Serumglobulin. Die radioaktive Aminosäure des Inkubationsansatzes wurde von den Milchdrüsenschnitten also erwartungsgemäß nur in die Milch-, nicht in die Serumproteine inkorporiert. Das beweist die ausschließliche Verwertung der Aminosäure (ohne Umweg über Serumproteine) zur Biosynthese der Milcheiweißstoffe in Drüsenschnitten und unterstreicht die Erhaltung der in vivo-Selektivität im in vitro-Versuch.

Zusammenfassung

1. β-Lactoglobulin wurde aus der Molke von Meerschweinchenmilch durch kontinuierliche Elektrophorese angereichert und durch Papierelektrophorese immunologisch rein dargestellt.

2. Inkubation von isolierten Zellen bzw. Milchdrüsenschnitten mit ^{14}C-L-Leucin führte zur in vitro-Biosynthese von ^{14}C-β-Lactoglobulin.

3. Dieses biosynthetische β-Lactoglobulin wurde papierelektrophoretisch, immunelektrophoretisch und durch die „Fingerabdruck"-Methode mit dem authentischen Protein aus Molke identifiziert. Während das Inkubationsmedium der Zellen frei von Serumproteinen ist, enthält das Medium der Schnitte (ebenso wie die Milch) auch Serumalbumin und Serum-α-Globulin, die beim in vitro-Versuch im Gegensatz zu den Milchproteinen (vor allem zum β-Lactoglobulin) jedoch nicht radioaktiv markiert werden.

Summary

1. β-lactoglobulin has been concentrated by continuous electrophoresis from the whey of guinea pig milk. An immunologically pure preparation has been obtained by subsequent electrophoresis.

2. The incubation of isolated cells or slices of the mammary gland with ^{14}C-L-leucine leads to an in vitro biosynthesis of ^{14}C-β-lactoglobulin.

3. By paper electrophoresis, immuno electrophoresis, and the "finger print" method this biosynthetic β-lactoglobulin has been found to be identical with the authentic protein from whey. While the incubation medium for the cells was free of serum proteins, the medium for the slices as well as the milk contained serum albumin and serum α-globulin.

In opposition to the milk proteins (especially β-lactoglobulin) these serum proteins did not contain any radioactive carbon after the in vitro experiments.

Literatur

[1] Kickhöfen, B., u. O. Westphal: Z. Naturforsch. **7**b, 659 (1952).
[2] Krebs, H. A., u. K. Henseleit: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **210**, 33 (1932).
[3] Levy, A. L., and L. Chung: Analyt. Chem. **25**, 396 (1953).
[4] Scheidegger, J. J.: Intern. Arch. Allergy appl. Immun. **7**, 103 (1955).
[5] Turba, F., u. H. J. Enenkel: Naturwissenschaften **37**, 93 (1950).
[6] Turba, F., u. H. Hilpert: Biochem. Z. **334**, 487 (1961).
[7] Turba, F., H. Peltzer u. H. Schuster: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **296**, 97 (1954).
[8] Turba, F., u. W. Zillig: Medizinische Grundlagenforschung **3**, 253 (1960).

Professor Dr. F. Turba,
Physiologisch-chemisches Institut der Universität Würzburg, Koellikerstraße 7

LEBENSLAUF

Am 30. März 1929 wurde ich, Helmut Hilpert, als 3. Kind des Studienprofessors Wilhelm Hilpert und seiner Ehefrau Mathilde geb. Kratz, in Speyer am Rhein geboren. 1935 trat ich in die Volksschule Speyer ein. 1937 übersiedelten meine Eltern nach Kaufbeuren im Allgäu, wo ich bis 1941 die Volksschule besuchte. Im gleichen Jahr trat ich in die damalige Aufbauschule in Kaufbeuren ein, welche ich ohne größere Unterbrechungen bis März 1945 besuchte. Nach der durch das Kriegsende bedingten Unterbrechung wurde der Unterricht im Dezember 1945 in Form einer Oberrealschule wieder aufgenommen. Im Juni 1948 legte ich an derselben Anstalt mit Erfolg die Reifeprüfung ab.

Im Sommersemester 1949 immatrikulierte ich an der erweiterten Phil.-Theol. Hochschule in Regensburg und begann mit dem Studium der Chemie. Nachdem ich im Wintersemester 1952/53 die Diplomchemiker-Vorprüfung an der Hochschule Regensburg abgelegt hatte, unterzog ich mich am 30. September 1955 an der Universiät München der Diplomchemiker-Hauptprüfung. Im darauffolgenden Wintersemester 1955/56 begann ich am damals noch in Regensburg befindlichen Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung mit der Anfertigung meiner Diplom-Arbeit (Thema: Ein Beitrag zur Synthese von Peptiden; Thioester als Carboxylschutzgruppe), die ich an dem inzwischen nach München verlegten Institut im Juni 1957 beendete.

Im August 1957 begann ich am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität München mit der Anfertigung meiner Doktorarbeit. Die praktische Durchführung erfolgte größtenteils im Rahmen der Forschungsaufgaben der Staatlichen Milchwirtschaftlichen Lehr- und Forschungsanstalt Wangen im Allgäu, wo ich seit August 1957 als wissenschaftlicher Mitarbeiter angestellt bin.